

10/519174

519, 174

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Januar 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/003548 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/50, 33/574

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/005763

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Juni 2003 (02.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: *26 Dec 04*
102 28 548.9 26. Juni 2002 (26.06.2002) DE
102 30 893.4 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): DR. FISCHER AG [LI/LI]; Lavadina 145 b, FL-9497 Triesenberg (LI).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HERWIG, Ralf [AT/AT]; Bichling 206, A-6363 Westendorf (AT).

(74) Anwälte: KRUSPIG, Volkmar usw.; Meissner, Bolte & Partner, Postfach 86 06 24, 81633 München (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHARACTERISTICS AND/OR THE CLASSIFICATION OF CIRCULATING MACROPHAGES, AND ANALYSIS ARRANGEMENT FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR EIGENSCHAFTSBESTIMMUNG UND/ODER KLASSIFIKATION VON ZIRKULIERENDEN MACROPHAGEN SOWIE ANALYSEANORDNUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

(57) Abstract: The invention relates to a method and an analysis arrangement for the determination of characteristics and/or classification of circulating macrophages. The whole blood drawn is subjected to a gradient centrifugation for isolating macrophages. The macrophage cells are then perforated and provided with an intracellular colouring by means of at least one selected antibody. A flow cytometric analysis of the pre-treated cells enables a subsequent statistical evaluation of the cell contents. A prostate specific antigen, a cytokeratin and/or an epithelial membrane antigen are selected as the antibodies.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Analyseanordnung zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen. Das entnommene Vollblut wird einer Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen unterzogen. Die Macrophagenzellen werden dann perforiert und mit einer intrazellulären Färbung mit mindestens einem ausgewählten Antikörper versehen. Eine durchflusszytometrische Analyse der vorbehandelten Zellen ermöglicht dann eine anschließende statistische Bewertung der Zellinhalte. Als Antikörper wird PSA, Cyto-keratin und/oder epitheliales Membranantigen ausgewählt.



WO 2004/003548 A1

Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen sowie Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens
Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen durch nicht zelleigene Antigene sowie eine Analyseanordnung zur Durchführung eines solchen Verfahrens.

Aus Sinha, Wilson, Gleason: Immunoelectron microscopic localization of prostatic-specific antigen in human prostate by the protein A-gold complex, Cancer, 1987, 60, 1288-91, ist es bekannt, elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen aus Prostatagewebe vorzunehmen, wobei nach der erwähnten Literaturstelle normale Gewebe aus der Prostata, Prostata-Karzinomgewebe und Prostata-Hyperplasiege- webe mit Gold-gelabelten PSA-Antikörpern inkubiert wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass sich die Goldpartikel im Cytoplasma, in intrazellulären Granula, dem RES und Lysosomen befinden. Mit zunehmender Entdifferenzierung eines Tumors erscheinen mehr Gold-Partikel in Membranstrukturen. Dies wurde als ein Zeichen dafür bewertet, dass PSA (Prostata-spezifisches-Antigen) mit zunehmender Entdif- ferenzierung der Tumorzellen in Membranstrukturen eingelagert wird. Ein weiterer Aspekt der dortigen Untersuchung war, dass Gold-Partikel ebenfalls in Granulozyten und Macrophagen erkannt wurden.

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden Zellen im zirkulierenden Blut gefunden, die PSA-positiv waren. Bei den vorbekannten Untersuchungen wurden aber nur die Oberflächen der Macrophagen für PSA gefärbt.

Die Tatsache, dass keine mRNA des PSA-Moleküls in den Macrophagen gefunden wurde, lässt nur den Schluss zu, dass nur das PSA-Molekül aufgenommen wird und es sich nicht um die Elimination von Mikrometastasen handelt. Verwiesen sei hier auf Brandt, Griwatz, Brinkmann: Circulating prostate-specific antigen/CD14-double- positive cells; a biomarker indicating low risk for hematogeneous metastasis of prostate cancer, J.Natl. Cancer Inst. 1997; 89, 174.

Bekanntermaßen werden bösartige Veränderungen von gewebsständigen Zellen, die in einem mehr oder weniger geordneten Zellhaufen zusammenliegen, als Tumor be- zeichnet. Diese Tumorzellen missachten die Ordnung der Gewebe, wachsen unge-

hemmt und expandieren durch Größenzunahme sowie durch Infiltration in das andere umliegende Gewebe, Organ, oder wachsen über die Organgrenzen hinaus in die Blutbahn und das Lymphsystem.

Erreicht ein Tumor die Blutbahn oder das Lymphsystem, so können hier die Einzelzellen oder Zellhaufen über diese Systeme abschwimmen und sich als Tochtergeschwülste, d.h. Metastasen an anderen Orten des Körpers festsetzen. Hier besteht die Gefahr, dass die Metastasen weiter wachsen und dem Körper Energie rauben, bis dieser schließlich verfällt und seiner Erkrankung erliegt.

Bei der Entwicklung eines solchen Tumors werden von den Tumorzellen Substanzen produziert, die dazu dienen, dieses Wachstum zu unterstützen. Zusätzlich können Stoffe freigesetzt werden, die als Indikator für Tumorstadium Verwendung finden. Letztere werden als Tumormarker bezeichnet. Diese Marker sind aber nicht spezifisch für einen Tumor, sondern nur die Höhe der gemessenen Konzentration im Blut, da auch gesunde Zellen derartige Stoffe freisetzen können. Tumormarker können daher nicht der Auffindung eines Tumors, sondern nur zur Kontrolle des Krankheits- oder Therapieverlaufs herangezogen werden. Ein spezifischer Marker für einen Tumor ist das Prostata-spezifische-Antigen (PSA), welches ab einer gewissen Konzentration im Blut auf ein Prostatakarzinom hinweist. Eine gutartige Vergrößerung der Prostata kann allerdings auch eine Erhöhung des PSA-Werts im Blut hervorrufen.

Bisher werden Tumorerkrankungen vorwiegend über bildgebende Verfahren, wie Ultraschall oder Computertomographie, Mammographie oder dergleichen diagnostiziert. Eine endgültige Entscheidung erfolgt allerdings erst nach einer tumorhaltigen Gewebeprobe mit Festlegung des Therapieverlaufs.

Das dem menschlichen Körper eigene Immunsystem wirkt Tumorerkrankungen entgegen. Dieses Immunsystem besteht aus einer Reihe von verschiedenen Zelltypen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Unter anderem haben die Macrophagen die Aufgabe, bestimmtes krankhaftes Material zu erkennen und es zu phagozytieren und in seine Bestandteile zu zerlegen. Anschließend werden Fragmente der gefressenen Zellen an der Oberfläche anderen Immunzellen präsentiert, damit diese die Möglichkeit haben, die Struktur zu erkennen, gegen die vorgegangen werden soll.

Es besteht ein dringendes Bedürfnis, bereits in einem frühzeitigen Stadium eine Eigenschaftsbestimmung von zirkulierenden Macrophagen vorzunehmen, ohne dass

unmittelbar Untersuchungen am menschlichen Körper vorgenommen werden müssen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren sowie eine Analyseanordnung anzugeben, mit deren Hilfe eine Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen (PBMC) möglich wird.

Erfindungsgemäß wird davon ausgegangen, dass Antigene oder Fragmente von phagozytierten Tumorzellen in zirkulierenden Macrophagen nachweisbar sind, so dass damit ein direkter und spezifischer Tumornachweis geführt werden kann.

Erfindungsgemäß wird eine Entnahme von Vollblut mit anschließender Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen vorgenommen. Die Macrophagenzellen werden dann perforiert und es wird eine intrazelluläre Färbung der Zellen mit mindestens einem ausgewählten Antikörper realisiert.

Im Anschluss wird auf die an sich bekannte Durchflusszytometrie zurückgegriffen, um die Zelleigenschaften auf Einzelebene zu dokumentieren.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Konkret wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben, z.B. Antikörpern, eine Bestimmung der Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelebene vorgenommen und dokumentiert.

Grundlage ist hier die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei entsprechender Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die

Zellgröße und die Binnenstruktur, d.h. Granularität des Zytoplasmas, die Größe des Zellkerns und so weiter gewonnen.

Als ausgewählte Antikörper kommen Prostata-spezifische Antigene, Cytokeratin-Antikörper und/oder epitheliales Membranantigen zur Anwendung.

Über die Färbung des PSA-Antikörpers in den Macrophagen ist dann erfindungsgemäß bestimmbar, ob das phagozytierte Material prostatarelevant ist.

Die Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens umfasst Mittel zur Heparinisierung von entnommenem Blut, einen Gradientenzentrifugator zur Isolation von Macrophagen, Mittel zur Zellperforation, eine Einrichtung zur intrazellulären Färbung mit fluorchromierten Antikörpern der vorbehandelten Zellen und ein Durchflusssystem mit rechnergestützter Auswerteeinheit zum Feststellen der intrazellulären Struktur der jeweils isolierten und vorbehandelten Zelle zum Zwecke der Tumorerkennung.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

Im Schritt der Blutentnahme und Färbung wird von beispielsweise 6 ml Vollblut ausgegangen, das einer Heparinisierung unterzogen wird. Mit Hilfe der Gradientenzentrifugation erfolgt eine Isolierung von Monozyten, Macrophagen und Lymphozyten.

In einem nächsten Schritt wird eine Formaldehydfixierung und Saponinbehandlung der Zellen zum Zwecke der Perforation durchgeführt.

Folgend schließt sich der Schritt der intrazellulären Färbung mit ausgewählten Antikörpern z.B. der nachstehenden Tabelle an.

PSA-Antikörper Ab-1 (Clone ER-PRS)

Pan-Cytokeratin-FITC

Epithelial Membrane Antigen (Clone E 29)

Isotypenkontrolle IgG1 (Clone DAK-GO1)

Sekundärantikörper FITC Ziege-Anti-Maus (DAKO)

Die entsprechend bis zur Analyse erneut fixierte Zelle wird dann mittels Durchflusszytometrie näher untersucht. Monozyten und Macrophagen werden gated, d.h. es wird nur ein Teil der Messergebnisse zur Auswertung herangezogen und eine Vorauswahl getroffen.

Über eine Histogrammauswertung wird dann die Isotypenkontrolle und Färbung beurteilt und es erfolgt eine Angabe der positiven Zellen, z.B. in Prozent.

Es hat sich gezeigt, dass bei der Färbung der Macrophagen mit Cytokeratin bei Patienten mit verstreutem Prostatatumor Anteile der Baustruktur von Gewebezellen in den zirkulierenden Immunzellen der entsprechenden Person zu finden sind. Da diese Bauelemente nicht ursprüngliche Inhalte der Immunzellen darstellen, müssen diese durch Phagozytose aufgenommen worden sein. Ein unspezifischer Effekt kann ausgeschlossen werden, da der aufgenommene Kurvenverlauf des Cytokeratins sich deutlich von dem des Isotyps unterscheidet.

Die Färbung des PSA in Macrophagen beweist, dass es sich bei dem phagozytierten Material um Prostatagewebe handeln muss, da auch dieser spezifische Marker nachweisbar ist.

Insgesamt ist mit dem beschriebenen Verfahren und der zugehörigen Analyseanordnung eine neuartige Methode zur Eigenschaftsbestimmung und Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen gegeben, wobei die Klassifikation Aussagen über mögliche prostatarelevante Inhalte zulässt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen und/oder peripheren blutmononuclearen Zellen mit folgenden Schritten:
 - Entnahme von Vollblut sowie Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen,
 - Perforation der Macrophagenzellen,
 - intrazelluläre Färbung der Zellen mit mindestens einem ausgewählten Antikörper sowie
 - durchflusszytometrische Analyse der vorbehandelten Zellen mit anschließender statistischer Bewertung über mehrere Zellen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Verwendung von Prostata-spezifischen Antigen (PSA), Cytokeratin und/oder epitheliales Membranantigen als dem oder den auszuwählenden Antikörpern.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch Histogrammauswertung der Isotypenkontrolle und Färbung nach durchgeführter Durchflusszytometrie.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche zum Erkennen von durch Phagozytose aufgenommenen Anteilen von Gewebezellen eines verstreuten Prostatumors außerhalb des menschlichen Körpers.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass über die Färbung des PSA in den Macrophagen bestimmt wird, ob das phagozytierte Material prostatarelevant ist.

6. Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorangegangenen Ansprüche, umfassend

Mittel zur Heparinisierung von entnommenem Blut, einen Gradientenzentrifugator zur Isolation von Macrophagen, Mittel zur Zellperforation, eine Einrichtung zur intrazellulären Färbung der vorbehandelten Zellen mit fluorchromierten Antikörpern und ein Durchflusszytometer mit rechnergestützter Auswerteeinheit zum Feststellen der intrazellulären Struktur der jeweils isolierten und vorbehandelten Zelle zum Zweck der Tumorfrüherkennung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/05763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N33/50 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>HERWIG RALF ET AL: "Circulating blood macrophages of prostate cancer patients contain PSA in combination with structures of epithelial origin." JOURNAL OF UROLOGY, vol. 169, no. 4 Supplement, April 2003 (2003-04), page 52 XP009019758 98th Annual Meeting of the American Urological Association (AUA); Chicago, IL, USA; April 26-May 02, 2003 ISSN: 0022-5347 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-6



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thumb, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/05763

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE CAESTECKER M P ET AL: "THE DETECTION OF INTRACYTOPLASMIC INTERLEUKIN-1-ALPHA INTERLEUKIN-1-BETA AND TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES USING TWO COLOUR IMMUNOFLOUORESCENCE FLOW CYTOMETRY" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 154, no. 1, 1992, pages 11-20, XP009019859 ISSN: 0022-1759 page 12, column 1, paragraph 2 -page 14, column 2, paragraph 1 the whole document	1, 3, 6
Y	---	2, 4, 5
X	BRANDT BURKHARD ET AL: "Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood" CANCER RESEARCH, vol. 56, no. 20, 1996, pages 4556-4561, XP001155823 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document	6
Y	---	1-5
X	DE 198 50 049 A (INST DIABETES GERHARDT KATSCH) 11 May 2000 (2000-05-11) the whole document	6
Y	---	1-5
X	KUSABA MIKAKO ET AL: "Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 25, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1466-1471, XP009019858 ISSN: 0315-162X page 1467, column 1, line 3 -column 2, line 6 the whole document	6
Y	---	1-5
A	SINHA A A ET AL: "IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF PROSTATIC-SPECIFIC ANTIGEN IN HUMAN PROSTATE BY THE PROTEIN A-GOLD COMPLEX" CANCER, vol. 60, no. 6, 1987, pages 1288-1293, XP001155947 ISSN: 0008-543X cited in the application the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/03/05763

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19850049	A	11-05-2000	DE 19850049 A1	11-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/03/05763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSCHUTZSTANDES
IPK 7 G01N33/50 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	HERWIG RALF ET AL: "Circulating blood macrophages of prostate cancer patients contain PSA in combination with structures of epithelial origin." JOURNAL OF UROLOGY, Bd. 169, Nr. 4 Supplement, April 2003 (2003-04), Seite 52 XP009019758 98th Annual Meeting of the American Urological Association (AUA); Chicago, IL, USA; April 26-May 02, 2003 ISSN: 0022-5347 das ganze Dokument --- -/--	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thumb, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE CAESTECKER M P ET AL: "THE DETECTION OF INTRACYTOPLASMIC INTERLEUKIN-1-ALPHA INTERLEUKIN-1-BETA AND TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES USING TWO COLOUR IMMUNOFLUORESCENCE FLOW CYTOMETRY" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 154, Nr. 1, 1992, Seiten 11-20, XP009019859 ISSN: 0022-1759 Seite 12, Spalte 1, Absatz 2 -Seite 14, Spalte 2, Absatz 1	1,3,6
Y	das ganze Dokument	2,4,5
X	BRANDT BURKHARD ET AL: "Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood" CANCER RESEARCH, Bd. 56, Nr. 20, 1996, Seiten 4556-4561, XP001155823 ISSN: 0008-5472 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	6
Y		1-5
X	DE 198 50 049 A (INST DIABETES GERHARDT KATSCH) 11. Mai 2000 (2000-05-11) das ganze Dokument	6
Y		1-5
X	KUSABA MIKAKO ET AL: "Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, Bd. 25, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1466-1471, XP009019858 ISSN: 0315-162X Seite 1467, Spalte 1, Zeile 3 -Spalte 2, Zeile 6	6
Y	das ganze Dokument	1-5
A	SINHA A A ET AL: "IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF PROSTATIC-SPECIFIC ANTIGEN IN HUMAN PROSTATE BY THE PROTEIN A-GOLD COMPLEX" CANCER, Bd. 60, Nr. 6, 1987, Seiten 1288-1293, XP001155947 ISSN: 0008-543X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-6

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/03/05763

Formblatt PCT/ISA'210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)